



**CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DEL ZORRO DE
CAMPO (*Lycalopex gymnocercus*) EN URUGUAY**

Hernán Juan

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas, Profundización en Evolución y
diversidad

Facultad de Ciencias - Udelar
Departamento de Biodiversidad y Genética
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Orientadora: Mag. Natalia Mannise

Montevideo, Uruguay

Mayo 2019

Indice

Agradecimientos	iv
Resumen	v
1. Introducción	1
1.1. Genética del paisaje	1
1.2. Unidades de manejo	2
1.3. Marcadores moleculares	3
1.4. El zorro de campo	4
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. Colecta de muestras, extracción de ADN e identificación de especies	10
3.2. Amplificación de microsatélites	11
3.3. Análisis de datos	13
3.3.1. Caracterización de los loci de microsatélites	13
3.3.1.1. Errores de genotipado	13
3.3.1.2. Variabilidad de los marcadores	14

3.3.1.3. Neutralidad y equilibrio de ligamiento	15
3.3.2. Estructuración genética poblacional	17
4. Resultados	21
4.1. Muestras de zorro de campo	21
4.2. Caracterización de loci de microsatélites	23
4.3. Estructuración genética poblacional	24
5. Discusión	34
5.1. Validación de la técnica y de los loci de microsatélites	34
5.2. Estructuración genética poblacional	36
5.3. Conclusiones y perspectivas	40
6. Bibliografía	42
ANEXO I	46
ANEXO II	49
ANEXO III	50
ANEXO IV	51
ANEXO V	52

Agradecimientos

A Natalia Mannise por todo lo enseñado, las oportunidades, su guía, y su paciencia.

A Mariana Cosse, Felipe Montenegro y Hugo Coitiño por sus aportes.

A los miembros del tribunal por su disposición.

A la CSIC por contribuir la financiación necesaria para la realización de este proyecto.

A las compañeras y compañeros del departamento de Biodiversidad y Genética por el excelente entorno brindado.

A las hermanas primos y amigos que acompañaron durante el trayecto, por el aguante.

A mis viejos por apoyarme desde siempre.

Resumen

La detección de patrones de estructuración genética en poblaciones naturales permite realizar inferencias sobre los procesos microevolutivos involucrados en dichos patrones. Los marcadores moleculares resultan de utilidad para esta clase de estudios, dado que aportan información acerca de la variabilidad genética de la especie y las relaciones de parentesco entre los individuos analizados. En el presente trabajo se analizó la configuración genético poblacional del zorro de campo en Uruguay a partir de marcadores de microsatélites. Se utilizaron muestras de tejido de animales atropellados colectadas en distintos puntos del territorio nacional. Se identificó la especie de las muestras mediante sondas de hibridación de ADN marcadas con fluorescencia, específicas para las especies de cánidos presentes en el territorio. Para las muestras de zorro de campo se evaluó un conjunto de microsatélites desarrollados para perro doméstico y previamente testeados en otros cánidos autóctonos de Uruguay. Se identificaron un total de 43 individuos de zorro de campo, para los que se amplificaron exitosamente 11 loci de microsatélites. La información obtenida de los marcadores moleculares se utilizó para inferir la existencia de subpoblaciones mediante análisis de asignación bayesiano. Los organismos fueron ubicados en el espacio para identificar patrones de estructuración en función de los grupos identificados. Los resultados obtenidos apuntan a la presencia de dos grupos con un grado de diferenciación leve. La distribución de los grupos es uniforme y no muestra patrones de agregación relacionados con el ambiente. Esto puede atribuirse a la situación biogeográfica del Uruguay como frontera entre regiones bióticas. Es posible que el territorio nacional forme parte de la zona de intercambio entre dos subpoblaciones de zorro de campo. La inclusión de individuos de regiones aledañas en el análisis aportará una visión más detallada de la estructuración de la especie. Alternativamente, es posible que la heterogeneidad ecológica de Uruguay esté dando lugar a la generación de grupos de individuos con hábitos y preferencias diferenciados. Si bien esto es menos probable dada la naturaleza generalista de la especie, un muestreo más exhaustivo del territorio nacional brindará una perspectiva más detallada de la estructuración genética de la especie.

Palabras clave: Ecología molecular; genética del paisaje; cánidos neotropicales; loci de microsatélites; muestreo no-invasivo

1. Introducción

1.1. Genética del paisaje

La genética del paisaje es una disciplina que estudia el efecto de las características ambientales sobre la distribución de la diversidad genética de las poblaciones naturales (Manel et al. 2003). Se diferencia de la biogeografía en el sentido de que busca determinar patrones de sub estructuración a nivel poblacional a diferentes escalas geográficas. Asimismo, permite estudiar los procesos micro evolutivos que tienen lugar en el presente o el pasado reciente sobre poblaciones actuales (Manel et al. 2003).

El enfoque de la genética del paisaje combina elementos de genética de poblaciones y ecología del paisaje y consta de dos etapas. La primera es la identificación de patrones genético-espaciales. Mediante el uso de marcadores moleculares y muestras georreferenciadas es posible mapear la variación de las frecuencias alélicas en el espacio, lo que permite identificar patrones genéticos tales como clinas, aislamiento por distancia, barreras genéticas y meta poblaciones (Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez 2013; Manel et al. 2003). Cuando los individuos presentan un grado de agregación espacial que permite realizar inferencias previas acerca de las subpoblaciones existentes, la estructuración genética puede ser evaluada por medio del estadístico F_{ST} y test de asignación (Paetkau et al. 1995; Pritchard et al. 2000). Sin embargo, la mayoría de los organismos no presentan una organización espacial clara, siendo comunes los casos en los que se observa una distribución uniforme dentro del rango geográfico de la población (Manel et al. 2003). La segunda etapa consiste en la

identificación de correlaciones entre los patrones genéticos y las características del ambiente. Para este paso es necesario cuantificar las variables ambientales para evaluar su relevancia. Asimismo, se deben identificar posibles barreras y corredores geográficos. Finalmente, se compara la escala del área de estudio con el rango de dispersión de la especie (Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez 2013; Manel et al. 2003).

1.2. Unidades de manejo

Los estudios efectuados en el campo de la genética del paisaje permiten delimitar y localizar entidades sub poblacionales que pueden actuar como fuentes de organismos, reservorios de diversidad genética o presentar adaptaciones locales (Manel et al. 2003; Palsbøll et al. 2007). Una de dichas entidades es la denominada “Unidad de manejo”, definida como una subpoblación lo suficientemente aislada del resto como para ser considerada demográficamente independiente (Palsbøll et al. 2007). El conocimiento de la configuración de las poblaciones naturales resulta de utilidad para la formulación de estrategias de monitoreo y manejo de la diversidad, ya que brinda una visión de las regiones y grupos de individuos a ser priorizados (Palsbøll et al. 2007).

La independencia entre subpoblaciones deriva del intercambio limitado de migrantes entre ellas. Las unidades de manejo pueden ser delimitadas como una función del aislamiento genético entre grupos de individuos (Palsbøll et al. 2007).

El umbral de divergencia para considerar a una subpoblación como independiente del resto no es un valor fijo, ya que depende del contexto de cada caso de estudio. Hastings (1993) plantea que dos subpoblaciones pueden ser consideradas como

demográficamente correlacionadas cuando la tasa de migración entre ellas es superior al 10%. Asumiendo condiciones de neutralidad y equilibrio entre deriva y migración, el grado de divergencia entre subpoblaciones es una función del flujo génico (Palsbøll et al. 2007).

En la actualidad, la asignación de individuos a subpoblaciones en base a frecuencias alélicas puede ser utilizada para definir potenciales unidades de manejo dentro de una población a partir de las frecuencias alélicas. Esta clase de análisis también son útiles para identificar posibles migrantes entre las subpoblaciones cuando se dispone de información espacial sobre el grupo de estudio, lo que puede ser utilizado para estimar tasas de dispersión entre grupos de individuos (Guillot et al. 2005; Palsbøll et al. 2007; Pritchard et al. 2000).

1.3. Marcadores moleculares

La información necesaria para realizar estudios genético-poblacionales se obtiene a partir de elementos genómicos que representativos de la variabilidad genética del grupo de estudio, denominados marcadores moleculares (Paetkau 1995).

Un tipo de marcadores son los microsatélites, secuencias de ADN formadas por múltiples repeticiones consecutivas de una secuencia corta, generalmente de menos de cinco pares de bases, flanqueadas por secuencias conservadas (Bruford & Wayne 1993; Jarne & Lagoda 1996). Presentan un número de características que los hacen adecuados como marcadores moleculares: se encuentran ubicuamente distribuidos en genomas eucariotas, y pueden ser compartidos entre taxones cercanamente

emparentados; son diploides; codominantes; selectivamente neutros y altamente polimórficos (Jarne & Lagoda 1996). Adicionalmente, los microsatélites presentan un mecanismo de mutación llamado 'slippage' o resbalón de la polimerasa que resulta en la adición o sustracción de repeticiones enteras de la secuencia básica (Jarne & Lagoda 1996). Dado que la mayor parte de la variabilidad alélica de los microsatélites está compuesta por variaciones en la longitud de la secuencia, ésta puede ser observada mediante electroforesis en capilar, sin necesidad de secuenciación (Bruford & Wayne 1993).

Las características de los microsatélites los vuelven útiles para la identificación de organismos individuales, así como para la inferencia de relaciones entre grupos de individuos de una misma especie (Bruford & Wayne 1993).

1.4. El zorro de campo

El zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) (Fig. 1) es un cánido de tamaño mediano nativo de la región centro-sur de Sudamérica (Lucherini et al. 2008). Su distribución abarca regiones en el este de Bolivia, oeste de Paraguay, sudeste de Brasil, norte y centro de Argentina y la totalidad del territorio de Uruguay (Lucherini et al. 2008) (Fig. 2).



Figura 1. Zorro de campo adulto. Pedregal ubicado al sur de Trinidad, Flores, Uruguay, 2018.

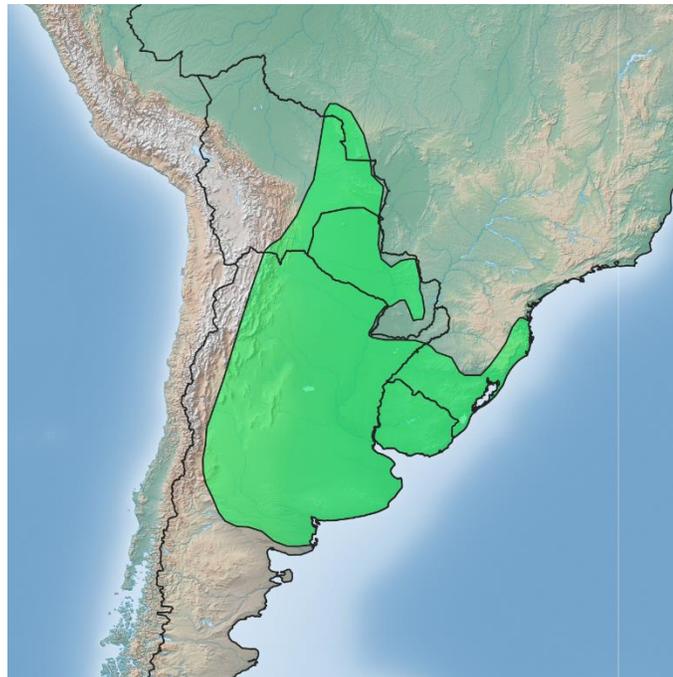


Figura 2. Rango de distribución del zorro de campo. Tomado de la lista roja de la IUCN (Lucherini 2016).

Se trata de una especie de hábitos nocturnos y crepusculares, con una dieta generalista que incluye pequeños vertebrados, artrópodos, carroña y frutos (Farias & Kittlein 2008; Lucherini et al. 2008). Los adultos suelen forrajear en solitario (García & Kittlein 2005). Forman parejas monógamas que permanecen juntas desde el apareamiento hasta que las crías abandonan la madriguera (aproximadamente a los tres meses de edad). Ambos padres protegen la madriguera, siendo el macho el encargado de brindar alimento a la hembra y las crías. Las madrigueras parecen no ser reutilizadas entre años (Lucherini et al. 2008; Di Bitteti et al. 2009).

Prefieren ambientes abiertos, siendo común observarlos en pastizales, pedregales, matorrales, humedales y médanos, también se encuentran presentes en bosques subtropicales y praderas modificadas por la agricultura y la ganadería (Brooks 1992; Lucherini et al. 2004; Di Bitteti et al. 2009).

El estado de conservación del zorro de campo es calificado como de preocupación menor por la lista roja de la IUCN (Lucherini 2016). Esfuerzos de monitoreo llevados a cabo en Argentina, Bolivia y Paraguay indican que se trata de una especie común, alcanzando densidades poblacionales de entre 1 y 1,8 individuos por kilómetro cuadrado (Brooks 1992; Ayala & Noss 2000; Lucherini 2004).

El zorro de campo se ha visto en conflicto con productores agrícolas, en particular con aquellos pertenecientes a los rubros lanero y avícola, debido a la percepción arraigada de esta especie como un depredador de animales domésticos (Lucherini 2016). A pesar de esto, actualmente se considera que la población de la especie se mantiene estable y con un bajo grado de fragmentación (Lucherini 2016).

Se trata de una especie tolerante a la actividad humana y a la antropización del ambiente (Lucherini et al. 2008, Lucherini 2016). Adicionalmente, el zorro de campo posee un número de características típicas de los mesopredadores; depredadores de tamaño mediano capaces de explotar un amplio rango de presas y alcanzar altas densidades poblacionales (Lucherini et al. 2008; Prugh et al. 2009; Ritchie et al. 2009). Las poblaciones de especies de esta categoría suelen estar controladas por presiones ejercidas por los depredadores dominantes de la comunidad. La exclusión de estos últimos puede desencadenar un rápido incremento de los mesopredadores, con subsecuentes cambios en las interacciones de la red trófica, en un proceso denominado "liberación de mesopredadores" (Prugh et al. 2009; Ritchie et al. 2009).

En Uruguay, existen pocas especies nativas que podrían regular las poblaciones de mesopredadores: el puma (*Puma concolor*) y el aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*). Para ambas hay registros dispersos y esporádicos, esto sugiere que no existen poblaciones estables en el territorio nacional (Nielsen et al. 2015; Paula & DeMatteo 2015).

Las poblaciones de mesopredadores también pueden ser afectadas por la productividad del entorno y la competencia a nivel intra gremial (Ritchie et al. 2009). Esta última puede intensificarse si múltiples poblaciones de mesopredadores dentro de una comunidad experimentan crecimientos simultáneos, lo que podría mitigar el efecto de la falta de depredadores dominantes (Ritchie et al. 2009).

Actualmente, el zorro de campo cohabita en Uruguay con el zorro de monte (*Cerdocyon thous*), una especie de características y requerimientos similares (Courtenay

& Maffei 2004); sin embargo, la competencia entre ambas especies es mitigada por modificaciones en el comportamiento del zorro de campo (Di Bitteti et al. 2009). Adicionalmente, ambas especies presentan una alta versatilidad y dietas generalistas. Por lo que es posible que la competencia por los recursos se vea mitigada por la alta disponibilidad de los mismos (Courtenay & Maffei 2004; Lucherini et al. 2008).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Analizar la estructuración y variabilidad genética de *Lycalopex gymnocercus* en el territorio uruguayo.

2.2. Objetivos específicos

- Genotipificar los individuos de *L. gymnocercus* de distintas localidades de Uruguay.
- Caracterizar un conjunto de loci de microsatélites para este tipo de muestras en zorro de campo.
- Evaluar la variabilidad y estructuración genética de la especie.
- Describir el patrón de estructuración genética de la especie en el contexto biogeográfico nacional.

3. Materiales y métodos

3.1. Colecta de muestras, extracción de ADN e identificación de especies

Se analizaron muestras de tejido tomadas de animales atropellados. Las colectas fueron desarrolladas en el marco de los proyectos “Impacto de rutas sobre la fauna de vertebrados del Uruguay” (Responsable: Hugo Coitiño, ONG ECOBIO Uruguay, financiado por Rufford Small Grants Foundation) y “Genética del paisaje: Impacto de las características del ambiente en la estructura genética de tres especies de mamíferos autóctonos” (Responsable: Dra. Mariana Cosse, IIBCE, Financiado por Fondo Clemente Estable-ANII). Las muestras fueron colectadas entre los años 2006 y 2016 (ANEXO I). En la Figura 3 se muestran las localidades de colecta de las distintas muestras.

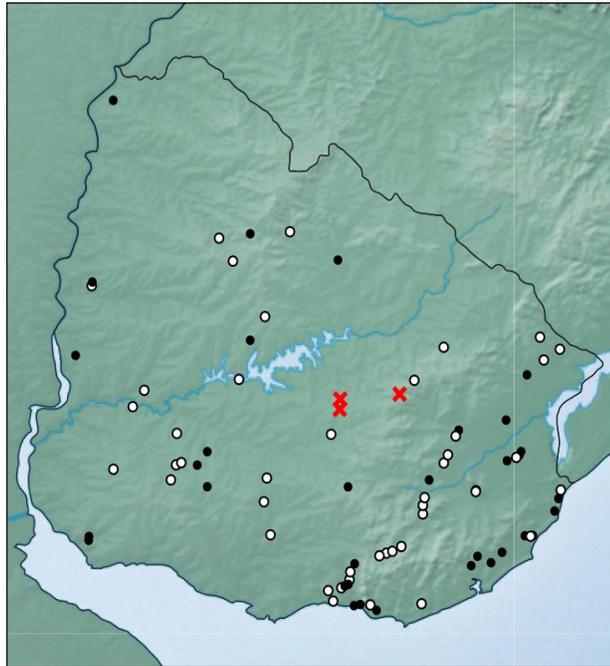


Figura 3. Mapa de las localidades de colecta de las muestras utilizadas en este estudio. Blanco: zorro de campo. Negro: zorro de monte. Los individuos para los que no se pudo determinar la especie se marcan con una equis roja.

Las extracciones de ADN se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por González (1997). La concentración y pureza del ADN aislado fueron medidas mediante nanoespectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000).

Se determinó la especie de los individuos muestreados mediante un experimento de PCR en tiempo real con tres sondas Taqman específicas para perro doméstico (*Canis lupus familiaris*), zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) y zorro de monte (*Cerdocyon thous*) (Cosse et al. 2017). Para ello se utilizó el equipo Rotor-Gen 6000 (Corbett Research) y se siguió el protocolo descrito por Cosse et al. (2017). Las reacciones consistieron en 10 µL SensiFastProbe PCR MasteMix (Bioline), 0,8 µL de cada cebador, 0,3 µL de cada sonda, 60 ng de ADN aproximadamente y agua hasta completar un volumen final de 20 µL. Las condiciones del ciclado fueron 95°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C 10 segundos y 62°C 60 segundos. Se utilizaron controles positivos de cada especie y negativos para cada reacción.

3.2. Amplificación de microsatélites

Para los individuos identificados como zorro de campo se realizaron amplificaciones por PCR tiempo final de doce loci de microsatélites desarrollados para perro doméstico (Mellersh et al. 1997; Fontoura-Rodrigues et al. 2008). En una primera instancia se comprobó la eficacia de amplificación del conjunto de cebadores para zorro de campo.

Las condiciones de reacción utilizadas fueron: 5 µL de Platinum MasterMix PCR (Invitrogen), 0,5 µM de cada cebador y agua hasta completar un volumen final de 10 µL.

Se añadió 1 μL de ADN a una concentración de 80 ng/ μL . El programa de termociclado consistió de: un período de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C 90 segundos, extensión 72°C por 50 segundos; finalizando con un período de extensión de 60°C durante 30 minutos.

Los once loci con mayor éxito de amplificación fueron organizados en tres multiplex (grupos), diseñados para evitar superposiciones entre los fluorocromos utilizados y el tamaño de los fragmentos amplificados (Tabla I).

Tabla I: Para cada locus de microsatélite se muestra el fluorocromo con el que está marcado, el rango de tamaño esperado en pares de bases (pb), la temperatura de anidamiento en °C y a que multiplex (A, B, C o D) corresponde cada uno.

Locus	Fluorocromo	Tamaño (pb)	Temperatura de anidamiento (°C)	Multiplex
FH2018	VIC	161-193	58	A
FH2328	FAM	192-247	58	A
FH2132	VIC	154-176	60	B
FH2010	FAM	200-240	59	B
FH2140	FAM	92-132	58	B
FH2137	TET	157-183	58	C
FH2848	HEX	223-243	58	C
FH2535	HEX	107-139	58	C
FH2226	HEX	171-209	58	D
REN105	FAM	225-253	58	D
FH2054	HEX	130-152	60	D

Se comprobó el éxito de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando como marcador GoodView™ Nucleic Acid Stain y cargando 4 µL de cada producto de PCR. Las corridas se detuvieron luego de haber avanzado hasta 75% del gel.

Los productos de las reacciones de PCR que fueron exitosas fueron enviados a correr en gel microcapilar al servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Institute Pasteur de Montevideo. Las corridas fueron realizadas en el equipo ABI3130 (Applied Biosystems) utilizando el standard de tamaño GS500 Liz.

La determinación de genotipos a partir de las corridas se realizó con el programa GenMarker ®. Se replicaron las amplificaciones y genotipados de 42 homocigotas y 33 heterocigotas a fin de corroborar los resultados obtenidos.

3.3. Análisis de datos

3.3.1. Caracterización de los loci de microsatélites

3.3.1.1. Errores de genotipado

La genotipificación a partir de marcadores de microsatélites es susceptible a errores (Dakin & Avise 2004). Estos se pueden categorizar en cuatro grupos de errores de acuerdo a: i- secuencia de ADN, ii- calidad del ADN, iii- efectos bioquímicos y iv- factores de manipulación humana (Dakin & Avise 2004; Pompanon et al. 2005). En las secuencias de ADN de ciertos alelos pueden ocurrir mutaciones en la región de unión a los cebadores, afectando la complementariedad de éstas. Esto reduce la eficiencia de amplificación de los alelos mutados, que muchas veces no se logran amplificar por PCR. Estos alelos se denominan alelos nulos (Dakin & Avise 2004; Pompanon et al. 2005).

Cuando existe baja calidad del ADN aislado quedan disponibles menos moléculas intactas y puede ocasionar alelos falsos o pérdida de alelos (Pompanon et al. 2005). Adicionalmente, la amplificación puede presentar un sesgo hacia los alelos más cortos, causando que los mismos se repliquen a una tasa más elevada y acaben por opacar a los de mayor tamaño (Dakin & Avise 2004). El tartamudeo durante la amplificación por PCR consiste en la adición accidental de repetidos por parte de la polimerasa, lo que acaba en la lectura de un genotipo erróneo. A su vez, pueden ocurrir errores humanos durante el preparado de la amplificación o la identificación de genotipos que causen la asignación incorrecta de alelos (Pompanon et al. 2005).

Estos errores generan patrones característicos en las frecuencias alélicas, a saber, deficiencias en la frecuencia de heterocigotas observados en loci específicos, lo que permite diferenciarlos de fenómenos naturales (Dakin & Avise 2004; Van Oosterhout et al. 2004).

Se utilizó el software MicroChecker (v 2.2.3) para determinar la presencia de errores de genotipado y en caso de detectarlos se generaron matrices genotípicas corregidas con el método de Brookfield I (Brookfield 1996).

3.3.1.2. Variabilidad de los marcadores

Para establecer el grado de variabilidad presentado por los loci de microsatélites utilizados, se evaluó el contenido de información polimórfica (PIC). Este se calcula en base a la cantidad de alelos detectables en un locus dado y la distribución de las

frecuencias alélicas. Es una medida de la utilidad del mismo para detectar polimorfismos en una población (Botstein et al. 1980). Se calcula siguiendo la fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^l P_i^2 - \sum_{i=1}^{l-1} \sum_{j=i+1}^l 2P_i^2 P_j^2$$

La probabilidad de no exclusión (NE) es la probabilidad de asignar para un individuo los parentales incorrectos, lo cual puede ocurrir cuando pares de individuos no relacionados tienen al menos un alelo en común en todos los loci estudiados (Marshall et al. 1998).

Mediante el software Cervus (v 3.0.3) se determinaron el número de alelos, la proporción de heterocigotas observada y esperada y PIC para cada locus (Marshall et al. 1998). Adicionalmente, se calcularon las probabilidades de no exclusión para asignar el primer y segundo parental (NE-1P, NE-2P) y el par parental (NE-PP).

3.3.1.3. Neutralidad y equilibrio de ligamiento

Para verificar el comportamiento neutral de los loci utilizados se realizó el test exacto de Hardy-Weinberg (Haldane 1954). Dicho análisis comprueba la probabilidad de que las frecuencias genotípicas en un locus dado se adecuen a las esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

El análisis fue realizado mediante Cadenas de Markov-Monte Carlo (Guo & Thompson 1992). Para esto se utilizó el software Genepop (v 4.2) (Rousset 2008). Se

simularon 1000 cadenas de Markov, con 1000 iteraciones previas (*burnin*) y 10000 iteraciones por repetición. Para el caso de los loci que se encontraron fuera del equilibrio luego de corregir los errores de genotipado, se aplicó la corrección de Bonferroni (Narum 2006).

Genepop (Rousset 2008) también fue utilizado para identificar desequilibrio de ligamiento entre pares de loci. Esto es, la asociación no aleatoria de alelos entre diferentes loci, causada por la proximidad física de los loci en un cromosoma. Es necesario evaluar la presencia de desequilibrio de ligamiento previo al análisis de datos con múltiples loci, ya que este fenómeno puede reducir la cantidad de información brindada por del conjunto de marcadores al provocar que parte de la variabilidad de dos loci ligados se transmita como si se tratara de una única entidad (Freeland 2005). Genepop detecta el desequilibrio de ligamiento mediante un test de asociación de frecuencias genotípicas entre pares de loci (Rousset 2008).

Para cada locus se calculó el estadístico F_{IS} , un indicador del grado de endogamia de cada individuo con respecto al resto de la subpoblación. Se evalúa como:

$$F_{IS} = (H_e - H_o)/H_e$$

Siendo H_e la proporción de heterocigotas esperados bajo equilibrio de Hardy Weinberg, dadas las frecuencias alélicas, y H_o la frecuencia de heterocigotas observados. Los valores de F_{IS} van de -1 (exceso de heterocigotas) a 1 (exceso de homocigotas). Cuando toma el valor de 0 se puede considerar que existe apareamiento al azar (Freeman 2005).

3.3.2. Estructuración genética poblacional

Para obtener una estimación estadística de la estructuración genética de zorro de campo se realizó un análisis en base a asignación de individuos (Pritchard et al. 2000). En el mismo se evalúa si la población se encuentra dividida en K grupos o *clusters* con frecuencias alélicas características. Se asume además que cada *cluster* se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento. El modelo se basa en un método de agrupamiento Bayesiano mediante el cual el genotipo de cada individuo se utiliza para asignar sus probabilidades de pertenecer a cada *cluster*, utilizando las frecuencias alélicas de los mismos como parámetros (Pritchard et al. 2000). Dicha probabilidad se calcula siguiendo la fórmula:

$$P(Z, P|X) \propto P(Z)P(X)P(X|Z, P)$$

Donde X corresponde al genotipo del individuo, Z la población de origen del individuo, y P a las frecuencias alélicas de las poblaciones. Las frecuencias alélicas de cada *cluster* se estiman simultáneamente junto con las membresías de los individuos mediante Cadenas de Markov con el método Monte Carlo (Pritchard et al. 2000).

Para estimar el número de *cluster* más probable se utilizó el software Structure (v 2.3.4) (Pritchard et al. 2000). Los parámetros de las Cadenas de Markov-Monte Carlo utilizadas fueron: 300000 iteraciones con 100000 iteraciones previas. El modelo empleado contempla la mezcla de individuos (*admixture*) y asume frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones. Se realizaron análisis para un número de poblaciones (K) de entre 1 y 10, con cinco iteraciones para cada K.

El análisis de Structure calcula la probabilidad posterior de K ($\ln P(D)$). Sin embargo, la precisión de esta estimación se reduce cuando se contempla un K mayor al número real de *clusters*, o la organización de los individuos se aparta del modelo de islas estándar. Evanno et al. (2005) identifican una magnitud (ΔK) basada en el segundo orden de cambio de magnitud de la probabilidad entre K que presenta un pico en el valor real de K.

Los resultados del análisis con Structure fueron procesados con el software Harvester (v 0.6.94) (Earl & von Holdt 2012) para determinar el K más probable por medio del método de Evanno (Evanno et al 2005).

Diferentes iteraciones del análisis de agrupamiento para un K dado, a menudo resultan en diferentes estimaciones de membresía de los individuos. Esto puede deberse a “cambios de etiqueta”, producto de la forma aleatoria en que el programa designa los *cluster*, aunque también puede ser causado por multimodalidad genuina en la población (Jakobsson & Rosenberg 2007). El método CLUMPP realiza permutaciones entre los resultados de las diferentes iteraciones y genera una matriz de membresía consenso, eliminando la incertidumbre por cambio de etiqueta y representando adecuadamente la multimodalidad, en caso de que la hubiera (Jakobsson & Rosenberg 2007).

En el caso de $K > 1$, los *clusters* resultantes fueron evaluados nuevamente para evaluar equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento. Adicionalmente, se determinó el grado de diferenciación genética entre los *clusters* utilizando el software FStat (v 2.9.4) (Goudet 1995) para calcular el estadístico F_{ST} y su grado de significancia estadística (valor de p).

Por otro lado, se utilizó el paquete de R Geneland (Guillot et al. 2004) para identificar posibles subdivisiones poblacionales en el espacio mediante la detección de quiebres en las frecuencias genotípicas. Geneland emplea un modelo similar al de Structure; sin embargo, incluye información geográfica de las muestras (las coordenadas de colecta) a fin de identificar posibles poblaciones con rangos de distribución discretos.

Se calculó distancia genética de Nei (D_A) (Nei et al. 1983) y $(\delta\mu)^2$ (Goldstein et al., 1995), con las fórmulas:

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_j^r \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij}y_{ij}}$$

y

$$(\delta\mu)^2 = \sum_j^r (\mu_{X_j} - \mu_{Y_j})^2 / r$$

r corresponde al número de loci, m_j al número de alelos para el locus j , x_{ij} e y_{ij} a las frecuencias del alelo i del locus j en las poblaciones X e Y respectivamente, y μ_{X_j} y μ_{Y_j} al promedio de estados alélicos del locus j en las poblaciones X e Y respectivamente.

Se construyó un árbol a partir de las distancias genéticas, mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) utilizando el software Populations (v 1.2.31) (Nei & Takezaki, 1996).

Las relaciones de parentesco entre individuos fueron estimadas mediante la herramienta ML-Relate (Kalinowski et al., 2006). El programa estima la relación entre pares de individuos a partir de la frecuencia de alelos compartidos. Mediante el método de máxima verosimilitud, los pares de individuos son categorizados en *Unrelated* (sin

relación), *Half Siblings* (medios hermanos), *Full Siblings* (hermanos completos) y *Parent/Offspring* (padres/hijos).

3.3.3. Identificación de patrones espaciales

Para detectar la existencia de organización espacial de la diversidad genética de los individuos, los linajes obtenidos a partir del cálculo de distancias genéticas fueron visualizados en el espacio. Adicionalmente, los grupos obtenidos a mediante asignación bayesiana fueron contrastados con mapas de unidades de paisaje y ecorregiones del Uruguay (Brazeiro 2015).

4. Resultados

4.1. Muestras de zorro de campo

A partir del conjunto de muestras procesadas se identificó un total de 54 individuos de zorro de campo (ANEXO I). Los puntos de colecta de zorro de campo se muestran en la Figura 4. La mayor parte de las muestras se concentran en las regiones centro y sureste; mientras que el litoral norte presenta un número reducido de muestras, y la región noreste, junto con el departamento de Artigas, no se encuentran representados.



Figura 4. Mapa con la ubicación de las muestras de zorro de campo analizadas en este trabajo.

Los resultados del PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan, permitieron asignar muestras a zorro de campo (canal verde, sonda TaqMan marcada con

fluorocromo FAM), zorro de monte (canal amarillo, TaqMan marcada con fluorocromo HEX), perro doméstico (canal rojo, TaqMan marcada con fluorocromo Cy5). Cuando una muestra presenta niveles de fluorescencia en un canal es porque existe complementariedad entre la sonda y el ADN de la muestra (Fig. 5).

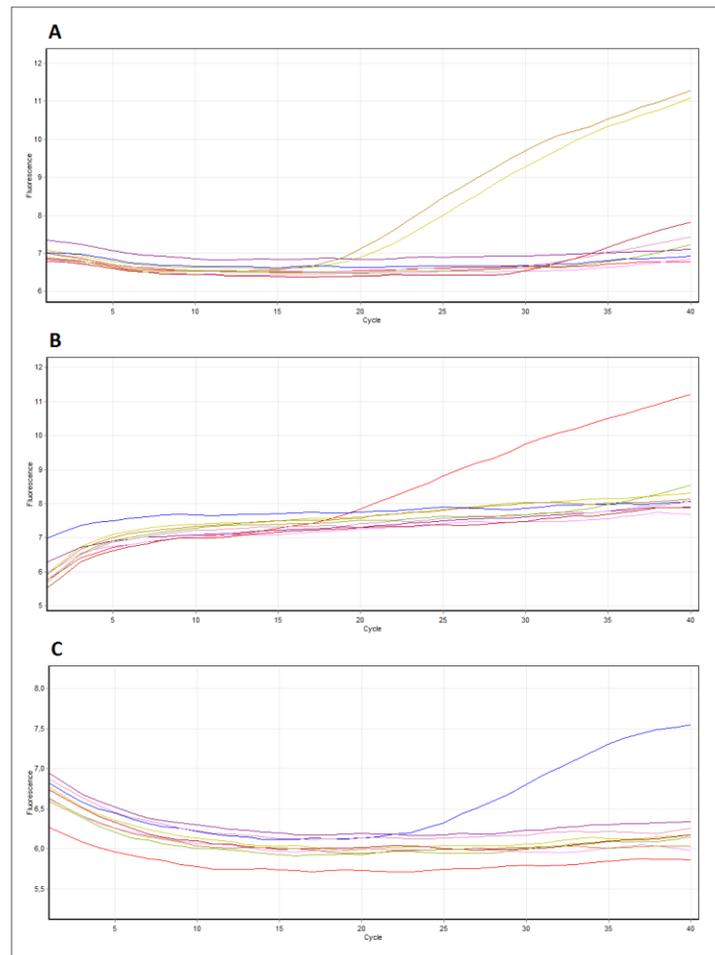


Figura 5. Resultado de identificación de especies de cánidos por PCR en tiempo real con sonda TaqMan. A: Canal verde (zorro de campo). B: Canal amarillo (zorro de monte). C: Canal Rojo (perro doméstico).

4.2. Caracterización de loci de microsatélites

Las amplificaciones por PCR de los loci de microsatélites fueron exitosas para once de los doce pares de cebadores testeados. Para un conjunto de 43 muestras se logró genotipar al menos 8 loci (ANEXO II).

Los análisis de errores de genotipado revelaron que los loci FH2010, FH2137 y FH2535 presentaron alelos nulos. Por medio del método de Brookfield se obtuvieron matrices genotípicas corregidas para estos loci (ANEXO III).

El número de alelos por locus varió entre 9 y 27, en promedio se encontraron 16,364 alelos por loci. El PIC promedio fue de 0,847 y las probabilidades de no exclusión promedio fueron de 0,415 y 0,267 para primer y segundo parentales respectivamente, y de 0,109 para el par parental. Los detalles para cada locus se muestran en la Tabla II. El análisis con el software Genepop no detectó pares de loci en desequilibrio de ligamiento. Sin embargo, los loci FH2018, FH2010, FH2137 y FH2535 se encontraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, incluso tras aplicar las correcciones de Bonferroni. Adicionalmente, estos cuatro loci presentaron los valores de F_{IS} más elevados dentro del conjunto de marcadores. El valor F_{IS} promedio para todos los loci fue de 0,1486.

Tabla II. Número de alelos (k), riqueza alélica (R), heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho), contenido de información polimórfica (PIC), probabilidad de no exclusión para el parental 1 (NE-1P), el parental 2 (NE-2p), el par parental (NE-PP) y valor F_{IS} (W&C). Los loci que se encontraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg se marcan con un asterisco.

Locus	k	R	He	Ho	PIC	NE-1P	NE-2P	NE-PP	F_{IS}
FH2018*	14	4.87	0.837	0.750	0.801	0.509	0.338	0.153	+0.1036
FH2328	27	6.51	0.936	0.909	0.918	0.265	0.153	0.037	+0.0288
FH2132	9	4.32	0.799	0.727	0.755	0.589	0.41	0.223	+0.0814
FH2010*	11	4.63	0.801	0.500	0.761	0.573	0.396	0.206	+0.3724
FH2140	16	5.36	0.833	0.744	0.811	0.487	0.318	0.131	+0.1076
Fh2137*	20	6.38	0.928	0.463	0.915	0.275	0.16	0.042	+0.5300
FH2848	13	5.15	0.850	0.884	0.812	0.492	0.323	0.142	-0.0486
FH2535*	15	5.74	0.889	0.721	0.867	0.386	0.239	0.084	+0.2164
FH2226	22	6.18	0.914	0.841	0.892	0.331	0.199	0.061	+0.0790
Ren105	15	5.89	0.904	0.818	0.882	0.357	0.217	0.072	+0.0942
FH2054	18	6.18	0.923	0.878	0.904	0.306	0.18	0.053	+0.0699

4.3. Estructuración genética poblacional

Los resultados del análisis de agrupamiento determinaron que los K más probables son 1 y 3 (Fig. 6, Fig. 7). K=1 presenta el mayor L(K): -2177.00; mientras K=3 presenta el mayor ΔK : 1.215107. La Figura 8 muestra la probabilidad de asignación de cada individuo a cada *cluster* para K = 3.

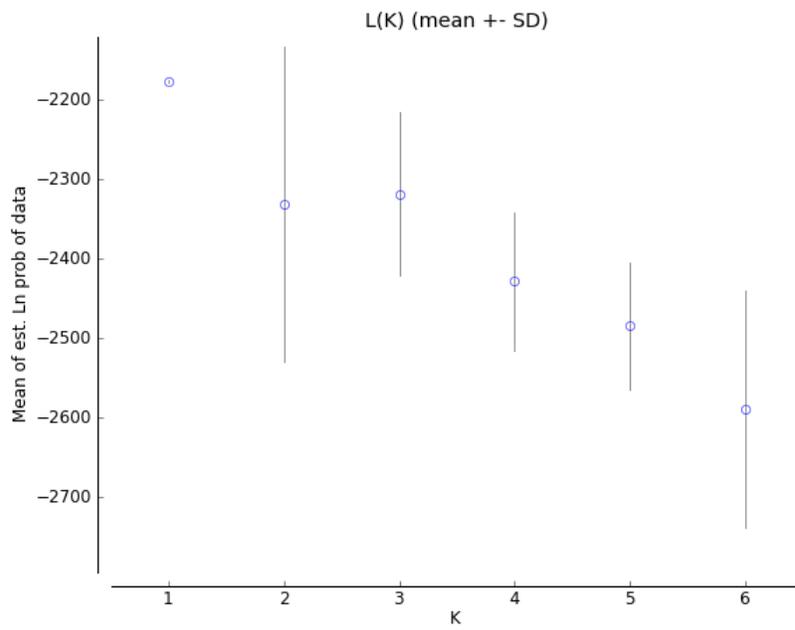


Figura 6. Valores medio de Ln(D) (máxima verosimilitud) y desvío estandar en función de K.

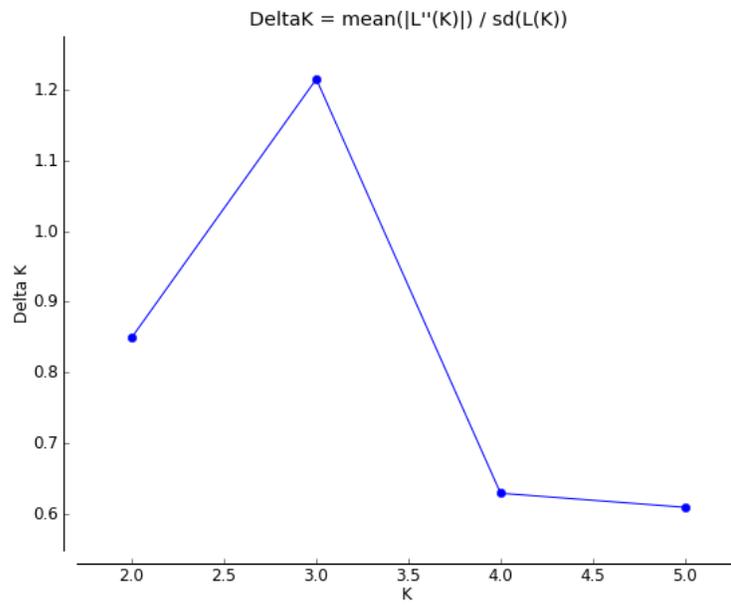


Figura 7. Tasa de cambio medio (ΔK) en función de K obtenido por el método de Evanno.

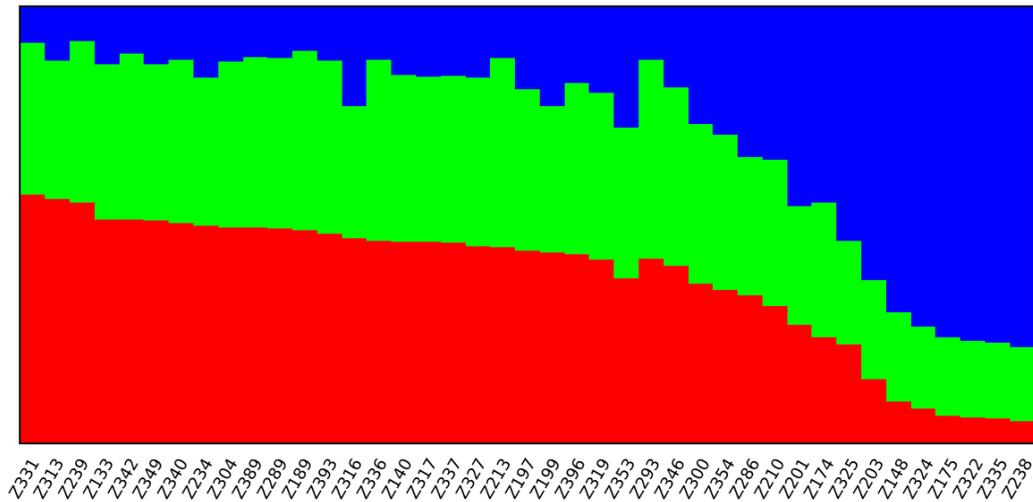


Figura 8. Consenso de probabilidades de cada individuo de pertenecer a cada uno de los 3 clusters estimados. Rojo = Cluster 1, Verde = Cluster 2, Azul = Cluster 3.

Los valores de F_{IS} para cada *cluster* fueron: 0,1662 para el cluster 1 (rojo), 0,0690, para el *cluster 2* (verde) y 0,1673 para el *cluster 3* (azul). Cuando se considera un único *cluster* el valor de F_{IS} = 0,1595.

La Tabla III muestra los valores de F_{ST} obtenidos entre cada par de *clusters*. Se observa que no existe diferenciación genética entre los *cluster 1* y 2, mientras que el *cluster 3* presenta un leve grado de diferenciación estadísticamente significativa con respecto a estos.

Tabla III. Valores de F_{ST} obtenidos para cada par de *clusters*, el p-valor se muestra entre paréntesis.

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Cluster 1	0.000		
Cluster 2	-0.0251(1)	0.000	
Cluster 3	0.0284(0.0167)	0.0276(0.0167)	0.000

El análisis con el software Geneland divide a los individuos en dos grupos (Fig. 9). El grupo 1 (amarillo) es menos numeroso y la mayoría de sus integrantes se concentran en las regiones centro y sureste del territorio. El grupo 2 (rojo) contiene a la mayoría de los individuos y su distribución abarca la mayoría del territorio.

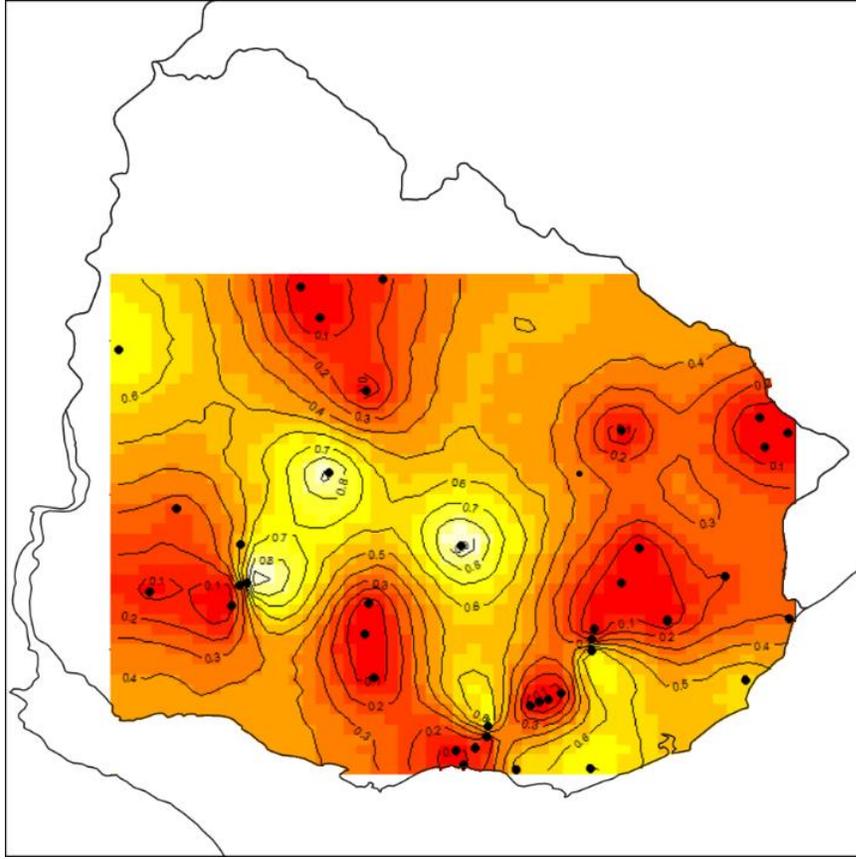


Figura 9. Áreas de distribución de los grupos estimados mediante el paquete Geneland. Amarillo: grupo 1. Rojo: grupo 2.

4.4. Identificación de patrones espaciales

La Figura 10 muestra la ubicación espacial de los individuos junto con su probabilidad de pertenecer a cada uno de los grupos definidos obtenida con el Structure.

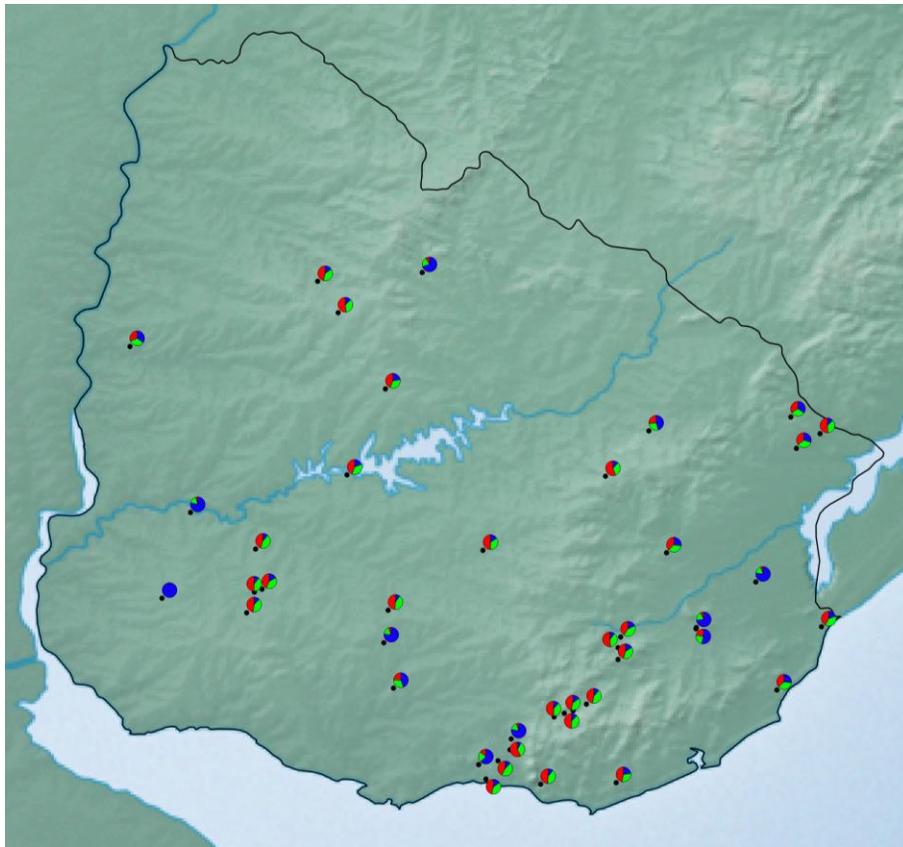


Figura 10. Porcentajes de pertenencia a los *clusters* del Structure de cada grupo, georreferenciados en el mapa. Rojo = *cluster* 1, Verde = *cluster* 2, azul = *cluster* 3.

Al visualizar los patrones de estructuración genética en función de las unidades del paisaje se encontró que la mayoría de los individuos fueron colectados en praderas o planicies (Fig. 11). Un número reducido de zorros fueron colectados en serranía, sin embargo, estos últimos no presentaron un grado de parentesco que los diferenciara del resto.

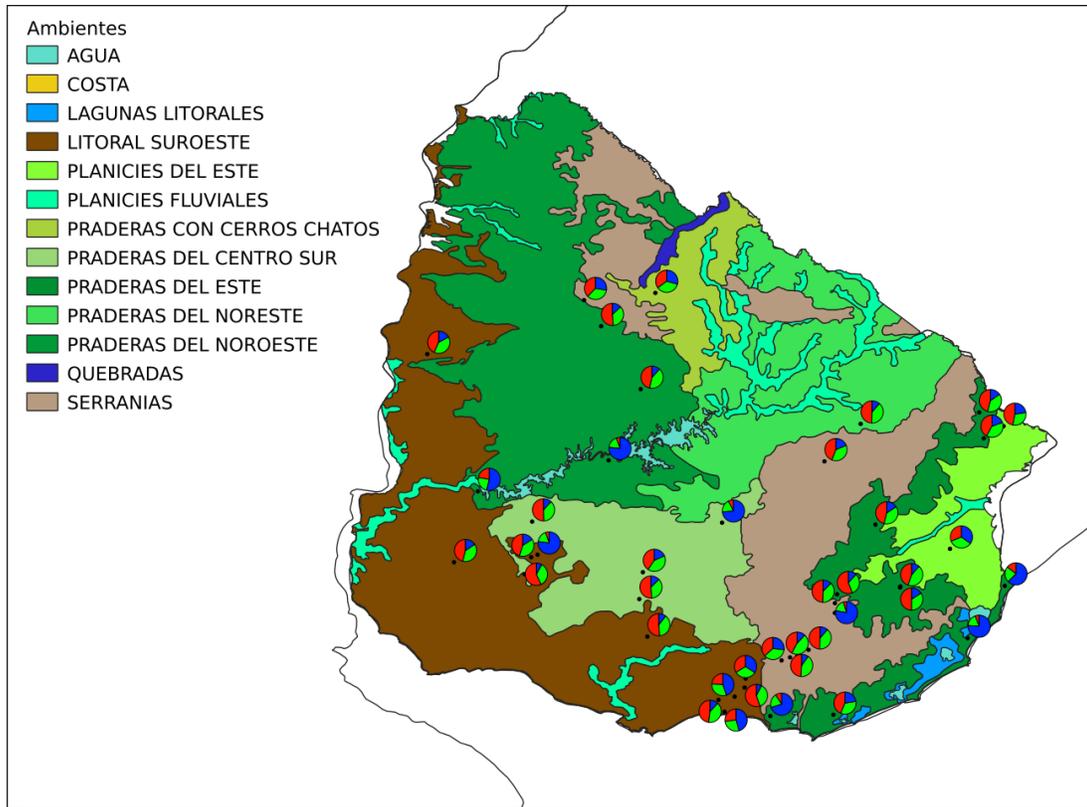


Figura 11. Distribución de los *clusters* identificados mediante el programa Structure en función de las unidades de paisaje del territorio.

Para ninguna ecorregión se detectaron *clusters* genéticos exclusivos (Fig. 12). En el presente estudio no se observó una correspondencia entre los *clusters* genéticos y las distintas ecorregiones (Fig. 12).

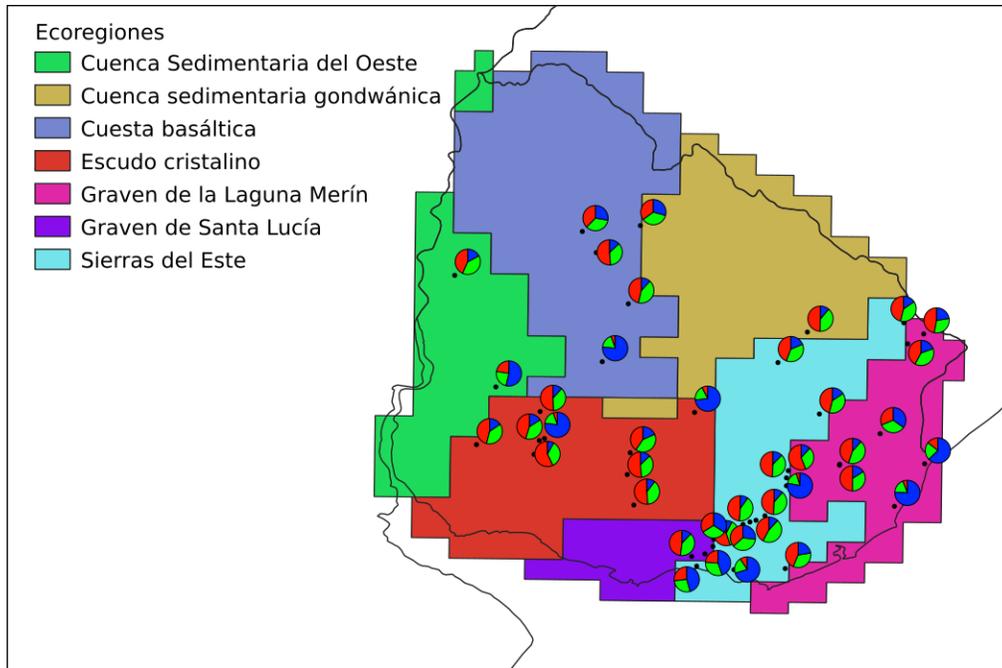


Figura 12. Distribución de los *clusters* identificados mediante el programa Structure en función de las ecoregiones delimitadas en base a las comunidades de vertebrados terrestres.

Los análisis de agrupamiento realizados con Structure y Geneland difieren en la asignación de individuos a los *clusters* identificados (ANEXO IV); sin embargo, se observa que el *cluster* 3 identificado en el análisis de Structure se conserva en el análisis de Geneland.

Se detectaron relaciones de parentesco de medio hermanos (*Half Siblings*) entre 42 pares de individuos (ANEXO V). El análisis determinó que existen dos pares de hermanos (*Full siblings*) en el grupo de estudio: Z313 y Z314, y Z339 y Z234. Se omitió un individuo de cada par (Z313 y Z339) del análisis de estructuración poblacional por agrupamiento para evitar errores de sobreestimación.

El árbol de distancias genéticas de Nei (D_A) entre individuos indica la presencia de cuatro linajes (Fig. 13). La Figura 14 muestra la distribución espacial de los individuos en función de sus linajes.

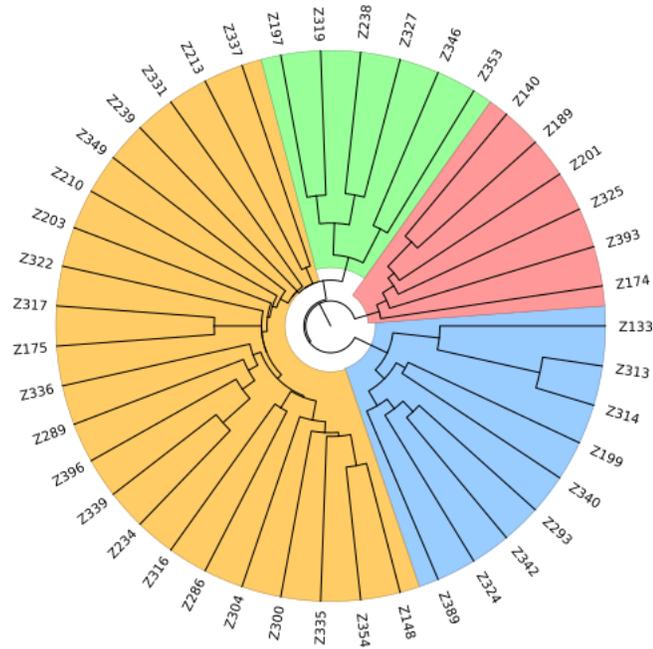


Figura 13. Árbol de distancias genéticas de Nei (D_A). Los colores indican los principales linajes identificados. Azul = Grupo 1. Naranja = Grupo 2. Verde = Grupo 3. Rojo = Grupo 4.



Figura 14. Distribución espacial de los linajes obtenidos con la distancia génica de Nei (D_A). El color de los puntos corresponde al linaje identificado en el árbol de distancias genéticas. Azul = Grupo 1. Naranja = Grupo 2. Verde = Grupo 3. Rojo = Grupo 4.

5. Discusión

5.1. Validación de la técnica y de los loci de microsatélites

El ADN extraído a partir de muestras de tejido de animales encontrados atropellados resultó de buena calidad (el promedio de la relación de absorbancia 280/260 nm de las muestras obtenidas fue de 1,72) y cantidad (concentración media de 286,0 ng/μl). Esto es consistente con la calidad y cantidad de ADN obtenidas por Lassevich (2014) a partir de muestras no invasivas de zorro de monte. El uso de métodos de muestreo no invasivo posee una serie de ventajas para estudiar animales con comportamiento elusivo o en bajas densidades. La principal ventaja es que son fáciles de coleccionar debido a que se encuentran depositadas en el ambiente (Smith & Wang 2014). Sin embargo, el uso de esta metodología puede implicar un reto ya que pueden ser difíciles de detectar en ciertos ambientes y el material puede estar degradado por su exposición a condiciones ambientales (Smith & Wang 2014). La exposición a la luz solar, altas temperaturas y humedad estimula la actividad exo y endonucleasa que degrada el ADN. Como resultado de este proceso la calidad del ADN resulta variable en las muestras coleccionadas (Smith & Wang 2014). A pesar de las desventajas mencionadas anteriormente, el ADN aislado en este estudio presentó niveles adecuados de calidad y cantidad que permitieron una exitosa amplificación en loci de microsatélites.

La determinación de especie de cánido mediante amplificación por PCR en tiempo real y uso de sondas TaqMan (Cosse et al. 2017) permitió seleccionar de manera eficiente aquellas muestras pertenecientes a zorro de campo. Los restos de animales encontrados atropellados pueden ser difíciles de determinar taxonómicamente debido al

estado de la muestra. Por esta razón, el empleo de técnicas moleculares eficientes resulta de alta importancia.

De los doce loci de microsatélites de perro doméstico seleccionados, once fueron amplificados con éxito en zorro de campo. Adicionalmente, presentaron niveles de diversidad alélica adecuados para la realización de estudios poblacionales (Tabla II). Asimismo, el conjunto de loci exhibió altos niveles de polimorfismo ($PIC = 0,85$) y de heterocigosidad observada y esperada ($H_e = 0,874$, $H_o = 0,749$) (Botstein et al. 1980). Las probabilidades de no exclusión promedio para cada parental ($NE-1P = 0,415$ y $NE-2P = 0,267$) y para el par parental ($NE-PP = 0,11$) fueron adecuados para realizar estudios de parentesco (Kalinowski, et al. 2007).

Luego de reconstruir las matrices genóticas con la corrección de alelos nulos, se encontró que los loci FH2018, FH2010, FH2137 y FH2535 se apartan del equilibrio de Hardy-Weinberg. Asimismo, estos loci presentaron un elevado déficit de heterocigotas (Tabla II). El resto de los alelos presentaron valores de F_{IS} menores o cercanos a 0,1. El valor F_{IS} promedio fue de 0,1486 y por lo tanto difiere levemente de cero.

Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg pueden estar asociadas a su ligamiento a regiones codificantes o reguladoras, lo cual iría en contraposición con la premisa de neutralidad que deben presentar los loci de microsatélites para estudios poblacionales. Por otra parte, la presencia de errores de genotipado (pérdida de alelos o alelos nulos) pueden producir deficiencias de heterocigotas en loci específicos (Dakin & Avise 2004). Sin embargo, el análisis de errores de genotipado detectó alelos nulos en tres de los once loci incluidos en este estudio. El apartamiento del equilibrio de Hardy-

Weinberg también puede ser reflejo de procesos biológicos subyacentes de una población, tales como patrones de apareamiento o de dispersión. Dakin & Avise (2004) sostienen que el déficit de heterocigotas causado por la presencia de alelos nulos puede diferenciarse de procesos naturales debido a que, en este último caso, el patrón debería observarse en todos los loci analizados. Factores estocásticos vinculados a la historia evolutiva de loci individuales conllevan a deficiencias de heterocigotas de forma heterogénea entre loci (Dharmarajan et al. 2013). En nuestro set de datos tan solo algunos loci de microsatélites quedaban fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg; por lo tanto, las causas del mismo estarían relacionadas con procesos de cada loci independiente y su historia evolutiva. A su vez, las características del muestreo pueden influir sobre las frecuencias genotípicas observadas. En este sentido, el efecto Wahlund consiste en reducciones de la heterocigosidad causadas por estructuración poblacional crítica. Este efecto puede producirse por la inclusión de individuos pertenecientes a subpoblaciones genéticamente diferenciadas en un único grupo (Dharmarajan et al. 2013). En este escenario, se analizó la presencia de subpoblaciones para el conjunto de muestras incluido en este estudio.

5.2. Estructuración genética poblacional

El número de subpoblaciones o *clusters* genéticos más probables obtenidos a partir del análisis de estructuración con Structure fueron $K = 1$ y $K = 3$. Este resultado se repite, aunque con un grado de diferenciación reducido, al excluir del análisis a un integrante de cada par de hermanos identificado.

La organización espacial de los individuos en función de la probabilidad de pertenencia a cada grupo no presenta un patrón geográfico definido (Fig. 9). Los individuos pertenecientes a los *clusters* 1 y 2 se distribuyen de manera uniforme en el territorio; mientras que los pertenecientes al *cluster* 3 (azul) se distribuyen en ciertas regiones que van desde el centro-oeste y sureste del territorio.

El análisis con el software Geneland (Fig. 10) separa a los organismos en dos grupos de distribuciones espaciales continuas. Contrastando los resultados de este análisis con los del software Structure se ven algunas diferencias con respecto a la asignación de individuos entre los *clusters* identificados. Esto puede deberse a que el algoritmo de Geneland incorpora la distribución espacial de los organismos y uno de sus supuestos iniciales es que las subpoblaciones presentan distribuciones espaciales discretas (Guillot et al. 2005). A pesar de estas diferencias, ambos análisis identifican la presencia de dos *clusters* genéticos: uno más numeroso y ampliamente distribuido en el territorio, y otro con menos individuos y restringido a la región centro y sur-este. Esto se ve apoyado por los resultados obtenidos con el índice F_{ST} , en donde se encuentra una diferencia leve y estadísticamente significativa entre el *cluster* 3 y los *cluster* 1 y 2.

La disposición espacial de los subgrupos identificados no presenta un patrón geográfico definido. Sin embargo, se detectaron individuos del centro y sur-este genéticamente diferenciados del resto. Al considerar este resultado se debe tener en cuenta que el área de muestreo utilizada en el presente trabajo representa una fracción intermedia dentro del continuo de la distribución del zorro de campo y no está delimitada por barreras físicas que impidan el tránsito de animales entre las regiones limítrofes. De esta manera, el muestreo no corresponde necesariamente a una población discreta. El

patrón observado puede entonces deberse a que el área de estudio se trate de una zona de contacto entre subpoblaciones localizadas hacia el Este y el Oeste del país (Brasil y Argentina), marcando la identidad genética de grupo de estudio con influencias de ambas.

Estudios similares han sido realizados anteriormente para zorro de monte en Uruguay (Lassevich 2014; Grattarola 2015). Si bien encontraron un alto grado de variabilidad en los marcadores utilizados, no detectaron diferenciación poblacional en el conjunto de muestras. En dicho análisis de la estructuración genética del zorro de monte, Grattarola (2015) concluye que para especies generalistas con gran capacidad de dispersión como el zorro de monte y de campo, los patrones de aislamiento por distancia deberían observarse a rangos geográficos amplios. Proponen que la segregación genética leve observada se debe a patrones de apareamiento y presencia de grupos familiares (Lassevich 2014; Grattarola 2015). En este estudio, los resultados del análisis de parentesco en zorro de campo no reflejan la presencia de numerosos individuos emparentados. Asimismo, los linajes observados a partir del árbol de distancia genética de Nei (DA) no presentan organización espacial. Esto indicaría que diferentes procesos podrían estar ocurriendo en ambas especies de zorros en Uruguay.

En el presente estudio se incluyeron muestras colectadas en diversos puntos del país; sin embargo, la región noreste se encuentra sub-muestreada. Adicionalmente, el área de distribución del zorro de campo se extiende fuera de los límites del territorio nacional, sin presentar barreras geográficas que limitan el intercambio de individuos. Teniendo en cuenta el grado de movilidad y la capacidad de dispersión de la especie en

estudio, es posible que la escala muestral de este trabajo sea menor que la de la estructuración poblacional de la especie.

Las unidades de paisaje no influyen en los patrones genéticos encontrados para la especie. Dada la estrategia de muestreo utilizada, se considera que puede existir un sesgo en la distribución de los organismos colectados. En este sentido, la mayor parte de las colectas fueron realizadas en ambientes abiertos, por lo cual no existe información comparable sobre otros ambientes.

La biota de Uruguay presenta influencias de las provincias biogeográficas aledañas Paranaense y Chaqueña, lo cual sumado a su alto grado de heterogeneidad ambiental conlleva a que presente una elevada diversidad a pesar de su superficie reducida (Brazeiro 2015). Las eco-regiones se definen como unidades de territorio que contienen ensambles de comunidades biológicas características y distintivas. Su identificación desde la biología de la conservación busca: identificar y delimitar poblaciones naturales, mantener los procesos ecológicos y evolutivos que generan la biodiversidad e identificar y mantener poblaciones y ambientes naturales (Brazeiro et al. 2012).

Las dos ecorregiones con mayor proporción de especies endémicas dentro del contexto del Uruguay fueron las menos representadas en el muestreo. La mayor parte de las colectas se llevaron a cabo en las ecorregiones con menor cantidad de especies exclusivas.

En Uruguay confluyen características de distintas regiones biogeográficas, lo que deriva en una comunidad biológica heterogénea. Estos factores podrían afectar los

patrones de estructuración genéticos del zorro de campo detectados. Dichos patrones pueden producirse a una escala mayor a la trabajada en este estudio. La organización espacial de los *clusters* identificados en los análisis de agrupamiento muestra que existe un grado de diferenciación genética entre los individuos del *cluster* azul y los restantes. Factores ecológicos localizados pueden influir en la estructuración genética de especies que poseen distribución continua y alta capacidad de dispersión (Pilot et al. 2006). Adicionalmente, para el caso de los carnívoros, la interacción con las especies presa puede influir en sus patrones demográficos (Dalén et al. 2004; Pilot et al. 2006).

5.3. Conclusiones y perspectivas

El conjunto de loci utilizado presentó niveles adecuados de polimorfismo y diversidad para realizar análisis de variabilidad genética y estructuración poblacional en zorro de campo. Se determinó que cuatro de los loci utilizados se apartaron del equilibrio de Hardy-Weinberg; esto fue causado por la presencia de alelos nulos en dichos loci. Si bien se efectuaron correcciones de frecuencias alélicas, en futuros estudios se propone excluir dichos loci con el fin de evitar sesgos provocados por cambios en las frecuencias alélicas.

El muestreo de tejidos a partir de animales atropellados es una herramienta útil para el monitoreo genético de poblaciones silvestres. Sin embargo, los resultados obtenidos destacan la importancia de considerar el tamaño de la escala espacial en la estrategia de muestreo.

Los análisis de estructuración genética poblacional indican la posibilidad de que el territorio nacional albergue individuos pertenecientes a dos subpoblaciones de zorro de campo con diferenciación leve y estadísticamente significativa. Este resultado debe ser abordado con mayor profundidad a partir de la inclusión de muestras del noreste de Uruguay y de áreas limítrofes. Un muestreo más exhaustivo también puede brindar una visión más detallada de la influencia de los factores ecológicos sobre los procesos demográficos de la especie.

Dado que el conjunto de muestras empleado se trata de una observación parcial de una distribución continua, los resultados obtenidos pueden indicar que Uruguay se trata de un sumidero o una zona de contacto entre dos poblaciones contiguas. Para evaluar estas hipótesis es necesario ampliar el área de estudio para incluir individuos de las regiones limítrofes.

6. Bibliografía

Ayala, J., & Noss, A. (2000). Censo por transectas en el Chaco boliviano: limitaciones biológicas y sociales de la metodología. Manejo de fauna silvestre en Amazonía y Latinoamérica (E Cabrera, C Mercolli y R Resquin, eds.). CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) Paraguay, Fundación Moises Bertoni, University of Florida, Asunción, Paraguay, 29-36.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314- 331.

Brazeiro, A. (2015). Eco-Regiones de Uruguay: Biodiversidad, Presiones y Conservación. Aportes a la Estrategia Nacional de Biodiversidad. Facultad de Ciencias, CIEDUR, VS-Uruguay, SZU. Montevideo. 122 p.

Brookfield, J. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5(3), 453-455.

Brooks, D. M. (1992). Notes on group size, density, and habitat association of the pampas fox (*Dusicyon gymnocerus*) in the Paraguayan Chaco. *Mammalia*, 56(2), 314-316.

Bruford, M. W., & Wayne, R. K. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current opinion in genetics & development*, 3(6), 939-943.

Cosse, M., Grattarola, F., & Mannise, N. (2017). A novel real-time TaqMan™ PCR assay for simultaneous detection of Neotropical fox species using noninvasive samples based on cytochrome c oxidase subunit II. *Mammal Research*, 62(4), 405-411.

Courtenay, O., & Maffei, L. (2004). En Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M., & Macdonald, D. W. (Eds.). *Canids: foxes, wolves, jackals, and dogs: status survey and conservation action plan* (63-68). Gland, Switzerland: IUCN.

Dakin, E. E., & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5), 504- 509.

Dalén, L., Fuglei, E. V. A., Hersteinsson, P., Kapel, C. M., Roth, J. D., Samelius, G., ... & Angerbjörn, A. (2004). Population history and genetic structure of a circumpolar species: the arctic fox. *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(1), 79-89.

Dharmarajan, G., Beatty, W. S., & Rhodes Jr, O. E. (2013). Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: dispelling unfounded expectations. *The Journal of Wildlife Management*, 77(2), 226-234.

Di Bitetti, M. S., Di Blanco, Y. E., Pereira, J. A., Paviolo, A., & Pérez, I. J. (2009). Time partitioning favors the coexistence of sympatric crab-eating foxes (*Cerdocyon*

thous) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*). *Journal of Mammalogy*, 90(2), 479-490.

Earl DA, Von Holdt BM. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.

Farias, A. A., & Kittlein, M. J. (2008). Small-scale spatial variability in the diet of pampas foxes (*Pseudalopex gymnocercus*) and human-induced changes in prey base. *Ecological Research*, 23(3), 543- 550.

Fontoura-Rodrigues, M. L. et al. (2008). Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. *Molecular Ecology Resources*, 8(4), 898–900.

Freeland, J. (2005). *Molecular ecology*. Chichester, West Sussex, England: John Wiley & Sons. Pp. 388.

García, V. B., & Kittlein, M. J. (2005). Diet, habitat use, and relative abundance of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) in northern Patagonia, Argentina. *Mammalian Biology*, 70(4), 218-226.

González, S. (1997). Estudio de la variabilidad morfológica, genética y molecular de poblaciones relictuales de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus* L. 1758) y sus consecuencias para la conservación. Tesis de Doctorado, PEDECIBA. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay.

Goudet, J. F. S. T. A. T. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity*, 86(6), 485-486.

Grattarola, F. (2015). Aportes de la ecología molecular al estudio de mamíferos en Uruguay. Tesis de maestría. PEDECIBA. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay.

Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F., & Cosson, J. F. (2005). A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170(3), 1261-1280.

Guo, S. W., & Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48(2), 361-372.

Haldane, J. S. (1954). An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics*, 52(1), 631-635.

Hastings, A. (1993). Complex interactions between dispersal and dynamics: lessons from coupled logistic equations. *Ecology*, 74(5), 1362-1372.

Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806.

Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 424-429.

Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 576-579.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology*, 16(5), 1099-1106.

Lassevich, D. (2014). Utilización de microsatélites para el estudio de poblaciones silvestres de zorro de monte (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Tesis de grado. Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay.

Lucherini, M., Pessino, M., Farias, A. A. (2004). En Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M., & Macdonald, D. W. (Eds.). *Canids: foxes, wolves, jackals, and dogs: status survey and conservation action plan* (63-68). Gland, Switzerland: IUCN.

Lucherini, M., & Luengos Vidal, E. M. (2008). *Lycalopex gymnocercus* (Carnivora: Canidae). *Mammalian Species*, 820, 1-9.

Lucherini, M. (2016). *Lycalopex gymnocercus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016:e.T6928A85371194. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T6928A85371194.en>

Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in ecology & evolution*, 18(4), 189-197.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27(2 Part 1), 209-220.

Mannise, N. (2009). Análisis de polimorfismos en microsatélites para *Ctenomys pearsoni*, Lessa & Langguth 1983. Tesis de grado. Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay.

Marshall, T. (1998). Cervus statistical software.

Mellersh, C. S., Langston, A. A., Acland, G. M., Fleming, M. A., Ray, K., Wiegand, N. A., ... & Ostrander, E. A. (1997). A linkage map of the canine genome. *Genomics*, 46(3), 326-336.

Narum, S. R. (2006). Beyond Bonferroni: less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 7(5), pp. 783–787.

Nielsen, C., Thompson, D., Kelly, M. & Lopez-Gonzalez, C.A. 2015. Puma concolor (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T18868A97216466. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T18868A50663436.en>.

Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., & Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular ecology*, 4(3), 347-354.

Palsbøll, P. J., Berube, M., & Allendorf, F. W. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in ecology & evolution*, 22(1), 11-16.

Paula, R.C. & DeMatteo, K. 2015. *Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T4819A88135664. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T4819A82316878.en>.

Pilot, M., Jedrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V. E., Jedrzejewska, B., Stachura, K., & Funk, S. M. (2006). Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular ecology*, 15(14), 4533-4553.

Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E., & Taberlet, P. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 847.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

Prugh, L. R., Stoner, C. J., Epps, C. W., Bean, W. T., Ripple, W. J., Laliberte, A. S., & Brashares, J. S. (2009). The rise of the mesopredator. *Bioscience*, 59(9), 779-791.

Ritchie, E. G., & Johnson, C. N. (2009). Predator interactions, mesopredator release and biodiversity conservation. *Ecology letters*, 12(9), 982-998.

Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.g

Smith, O. and Wang, J. (2014). When can non-invasive samples provide sufficient information in conservation genetics studies?. *Molecular Ecology Resources*, 14(5), pp. 1011–1023.

Takezaki, N., & Nei, M. (1996). Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144(1), 389-399.

Van Oosterhout, C. et al. (2004). Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), pp. 535–538.

Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28(2), 114- 138.

ANEXO I

Lista de muestras de tejido colectadas. Para cada muestra se registraron la fecha, el Departamento y las coordenadas de colecta. Se indica además la concentración de ADN obtenida, la pureza (medida como la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm) y la especie determinada mediante sonda TaqMan.

Muestra	Fecha de colecta	Latitud	Longitud	Departamento	Concentración(ng/μL)	260/280	Especie
Z133	09/04/2006	-31.847806	-56.543222	Salto	554.2	1.34	<i>L. gymnocercus</i>
Z140	08/07/2006	-31.651889	-56.671806	Salto	81.5	1.62	<i>L. gymnocercus</i>
Z148	24/04/2010	-31.597194	-56.014167	Tacuarembó	239.1	1.84	<i>L. gymnocercus</i>
Z174	01/03/2013	-34.187239	-56.194983	Florida	357.0	1.75	<i>L. gymnocercus</i>
Z175	01/03/2013	-33.904508	-56.255734	Florida	2324.0	1.83	<i>L. gymnocercus</i>
Z189	25/05/2013	-33.701944	-56.228778	Florida	83.8	1.79	<i>L. gymnocercus</i>
Z197	26/05/2013	-32.858722	-56.487250	Durazno	1703.1	1.77	<i>L. gymnocercus</i>
Z199	26/05/2013	-32.322417	-56.245806	Tacuarembó	135.7	1.41	<i>L. gymnocercus</i>
Z201	27/05/2013	-32.584111	-54.588444	Cerro Largo	418.8	1.67	<i>L. gymnocercus</i>
Z203	17/06/2013	-34.663956	-55.659185	Canelones	1448.0	1.95	<i>L. gymnocercus</i>
Z210	29/10/2013	-32.058373	-57.852910	Paysandu	175.8	1.77	<i>L. gymnocercus</i>
Z213	29/10/2013	-33.320626	-57.062916	Flores	2863.5	1.79	<i>L. gymnocercus</i>
Z234	05/2014	-33.328642	-55.632320	Durazno	4572.0	0.95	<i>L. gymnocercus</i>
Z238	09/05/2014	-33.092353	-57.471870	Soriano	1086.7	1.86	<i>L. gymnocercus</i>
Z239	09/05/2014	-33.626823	-57.651358	Soriano	432.1	1.81	<i>L. gymnocercus</i>
Z286	20/06/2015	-32.497909	-53.695575	Cerro Largo	46.8	1.99	<i>L. gymnocercus</i>
Z289	18/04/2015	-34.786163	-55.268834	Maldonado	425.7	1.81	<i>L. gymnocercus</i>
Z293	19/06/2015	-34.639802	-55.537325	Canelones	286.6	1.79	<i>L. gymnocercus</i>
Z300	19/06/2015	-34.198882	-53.782850	Rocha	646.7	1.83	<i>L. gymnocercus</i>
Z304	05/09/2015	-34.343898	-55.120269	Lavalleja	265.1	1.77	<i>L. gymnocercus</i>
Z313	06/09/2015	-32.866554	-54.861172	Cerro Largo	161.3	1.79	<i>L. gymnocercus</i>
Z314	05/09/2015	-33.573550	-54.587910	Lavalleja	97.0	1.69	<i>L. gymnocercus</i>
Z316	05/09/2015	-34.776193	-54.793900	Maldonado	205.5	1.87	<i>L. gymnocercus</i>
Z317	05/09/2015	-34.753767	-55.613471	Canelones	209.5	1.8	<i>L. gymnocercus</i>
Z319	06/09/2015	-33.804829	-53.502668	Rocha	377.0	1.77	<i>L. gymnocercus</i>
Z322	19/04/2015	-33.525665	-53.915327	Rocha	316.5	1.49	<i>L. gymnocercus</i>
Z324	19/04/2015	-33.809304	-54.289609	Rocha	1149.0	1.76	<i>L. gymnocercus</i>
Z325	19/04/2015	-33.817556	-54.291582	Rocha	1112.5	1.79	<i>L. gymnocercus</i>

Z327	18/04/2015	-34.008762	-54.782479	Lavalleja	1230.6	1.84	<i>L. gymnocercus</i>
Z331	18/04/2015	-34.571369	-55.462480	Lavalleja	105.9	1.31	<i>L. gymnocercus</i>
Z335	19/06/2015	-34.503546	-55.454580	Lavalleja	75.1	1.8	<i>L. gymnocercus</i>
Z336	19/06/2015	-34.286856	-54.981233	Lavalleja	236.4	1.79	<i>L. gymnocercus</i>
Z337	19/06/2015	-34.328061	-55.064545	Lavalleja	50.1	1.85	<i>L. gymnocercus</i>
Z339	19/06/2015	-33.503729	-54.549624	Lavalleja	573.7	1.81	<i>L. gymnocercus</i>
Z340	19/06/2015	-34.366506	-55.184212	Lavalleja	294.8	1.8	<i>L. gymnocercus</i>
Z342	19/06/2015	-33.935339	-54.782176	Lavalleja	228.3	1.82	<i>L. gymnocercus</i>
Z346	19/06/2015	-33.868641	-54.765961	Lavalleja	512.1	1.81	<i>L. gymnocercus</i>
Z349	20/06/2015	-32.601362	-53.511427	Cerro Largo	57.8	1.12	<i>L. gymnocercus</i>
Z353	19/06/2015	-33.343266	-54.476955	Treinta y tres	321.0	1.78	<i>L. gymnocercus</i>
Z354	20/06/2015	-32.693176	-53.660045	Cerro Largo	189.8	1.81	<i>L. gymnocercus</i>
Z389	22/10/2017	-33.588742	-57.070247	Flores	151.1	1.72	<i>L. gymnocercus</i>
Z393	10/11/2017	-33.717604	-57.118879	Flores	85.7	1.78	<i>L. gymnocercus</i>
Z396	19/11/2017	-33.570323	-57.022021	Flores	62.9	1.71	<i>L. gymnocercus</i>
Z192	25/05/2013	-33.028083	-55.547778	Durazno	16.7	2.04	<i>C.thous</i>
Z193	25/05/2013	-33.114083	-55.551944	Durazno	26.9	1.89	<i>C.thous</i>
Z198	26/05/2013	-32.524333	-56.383639	Tacuarembó	1703.9	1.77	<i>C.thous</i>
Z200	26/05/2013	-31.839028	-55.569333	Tacuarembó	96.7	1.7	<i>C.thous</i>
z211	29/10/2013	-32.952253	-57.365467	Rio Negro	412.4	1.59	<i>C.thous</i>
z230	29/10/2013	-32.985049	-54.997387	Treinta y Tres	112.6	1.66	<i>C.thous</i>
Z235	06/04/2014	-30.47386	-57.653421	Artigas	2840.1	1.85	<i>C.thous</i>
Z240	05/2014	-32.654052	-58.002404	Rio Negro	826.8	1.77	<i>C.thous</i>
Z241	15/05/2014	-32.026165	-57.84691	Paysandu	1779.8	1.55	<i>C.thous</i>
Z244	19/05/2014	-31.614356	-56.382652	Salto	760.7	1.52	<i>C.thous</i>
Z284	19/06/2015	-34.193012	-53.761603	Rocha	308.4	1.82	<i>C.thous</i>
z288	18/04/2015	-34.194758	-53.835436	Rocha	356.9	1.85	<i>C.thous</i>
z292	18/04/2015	-34.425271	-54.150204	Rocha	1503.5	1.82	<i>C.thous</i>
Z297	21/06/2015	-33.47576	-53.870624	Rocha	434.1	1.87	<i>C.thous</i>
Z298	21/06/2015	-33.505694	-53.887238	Rocha	491	1.74	<i>C.thous</i>
Z302	19/06/2015	-34.336609	-54.047459	Rocha	152.6	1.4	<i>C.thous</i>
Z309	05/09/2015	-33.7178	-54.72342	Lavalleja	234.2	1.77	<i>C.thous</i>
Z310	06/09/2015	-33.776918	-55.475667	Florida	254	1.81	<i>C.thous</i>
Z318	05/09/2015	-34.370564	-54.27543	Rocha	646.1	1.91	<i>C.thous</i>
Z323	19/04/2015	-33.553765	-54.001001	Rocha	125.6	0.69	<i>C.thous</i>
Z326	19/04/2015	-33.206586	-54.010083	Treinta y Tres	818.1	1.87	<i>C.thous</i>
Z329	18/04/2015	-33.293222	-54.449303	Treinta y Tres	353.1	1.81	<i>C.thous</i>
Z330	18/04/2015	-34.434009	-55.414501	Lavalleja	417.3	1.8	<i>C.thous</i>
Z332	19/06/2015	-34.624427	-55.50604	Canelones	483.3	1.8	<i>C.thous</i>
Z333	19/06/2015	-34.610632	-55.473151	Lavalleja	96	1.98	<i>C.thous</i>
Z351	20/06/2015	-32.819848	-53.816132	Treinta y Tres	194.9	1.84	<i>C.thous</i>
Z360	19/06/2015	-34.782072	-55.362086	Maldonado	548.2	1.76	<i>C.thous</i>
Z372	06/2014	-34.792222	-55.419444	Canelones	418.6	1.77	<i>C.thous</i>

Z379	25/10/2014	-34.832222	-55.211667	Maldonado	581.4	1.78	<i>C.thous</i>
Z381	09/2014	-33.876944	-53.523889	Rocha	847.1	1.85	<i>C.thous</i>
Z382	29/9/2014	-33.983611	-53.559722	Rocha	493.6	1.84	<i>C.thous</i>
Z384	19/3/2015	-34.450556	-54.333333	Rocha	682.4	1.88	<i>C.thous</i>
Z390	4/11/2017	-33.776029	-56.781156	Flores	182.3	1.86	<i>C.thous</i>
Z391	4/11/2017	-33.476273	-56.781043	Flores	61.4	1.79	<i>C.thous</i>
Z392	5/11/2017	-33.591626	-56.874213	Flores	506.4	1.82	<i>C.thous</i>
Z394	12/11/2017	-34.234312	-57.881045	Colonia	139.2	1.71	<i>C.thous</i>
Z395	12/11/2017	-34.201354	-57.878328	Colonia	80.6	1.79	<i>C.thous</i>

ANEXO II

Matriz de genotipos obtenidos para las muestras de zorro de campo (*Lycalopex gymnocercus*) analizadas. El valor 000 representa los loci que no pudieron ser genotipados.

Loci

Muestra	FH2018		FH2328		FH2132		FH2010		FH2140		FH2137		FH2848		FH2535		FH2226		Ren105		FH2054	
Z133	166	170	231	259	162	162	200	200	093	093	151	151	235	239	128	128	264	202	223	231	139	141
Z140	154	166	207	207	154	154	212	212	089	109	157	163	231	239	118	132	186	186	231	231	131	143
Z148	158	166	231	267	154	154	220	220	109	131	159	185	231	237	124	128	198	218	231	237	139	173
Z174	154	170	219	235	150	174	212	212	089	093	157	165	225	235	136	136	172	204	235	235	165	173
Z175	134	138	183	243	154	162	220	220	089	127	157	157	231	239	124	130	178	198	239	243	151	169
Z189	154	166	199	199	154	154	212	212	089	115	155	157	229	235	128	132	190	202	237	247	137	143
Z197	162	166	207	223	158	158	200	232	109	109	153	153	229	235	124	130	202	202	229	237	133	147
Z199	154	166	231	235	158	162	200	228	085	091	143	143	229	237	120	134	198	198	237	239	151	165
Z201	154	154	211	223	154	154	232	232	089	119	163	165	217	239	128	134	178	194	233	239	143	161
Z203	158	162	213	231	158	170	220	220	091	107	163	163	227	233	126	128	186	190	225	243	139	151
Z210	166	166	215	239	150	154	224	224	083	089	155	159	237	239	120	120	172	194	217	217	139	165
Z213	140	150	215	219	158	174	220	224	095	123	000	000	237	241	124	132	194	202	237	247	137	151
Z234	166	166	207	215	150	162	200	228	089	089	000	0000	000	000	000	000	226	226	229	237	135	143
Z238	162	166	215	223	150	178	200	200	083	109	161	175	215	237	128	136	188	202	233	237	147	189
Z239	148	158	211	227	150	154	200	224	107	107	157	157	233	235	118	128	194	210	237	237	147	169
Z286	158	162	223	225	154	154	200	200	089	109	159	159	229	235	116	120	198	200	225	239	000	000
Z289	166	166	219	235	146	150	220	220	089	089	173	173	229	237	128	128	172	198	231	231	143	147
Z293	166	166	203	223	146	162	212	220	089	089	157	157	235	237	120	124	190	194	231	237	000	000
Z300	158	186	207	223	146	154	200	220	131	131	161	161	231	237	128	132	198	202	229	239	147	147
Z304	154	158	231	235	150	154	208	214	099	109	199	199	225	237	128	130	176	218	235	237	151	151
Z313	162	170	223	235	162	166	192	200	089	089	151	169	235	237	128	134	198	206	231	233	137	139
Z314	142	150	203	213	162	166	200	200	089	089	151	169	235	237	128	134	198	206	231	233	137	139
Z316	158	162	237	267	146	154	220	232	089	089	181	231	229	229	120	120	194	214	229	237	139	169
Z317	134	170	213	223	150	154	220	220	089	127	161	173	223	239	124	128	194	198	223	239	135	147
Z319	162	166	203	207	154	158	200	200	109	127	157	177	227	237	128	128	202	206	237	243	147	147
Z322	158	162	211	223	150	150	220	220	115	127	153	161	217	237	128	138	198	198	235	247	137	143
Z324	154	166	211	229	158	162	208	232	089	123	157	159	227	233	138	138	194	198	231	237	151	151
Z325	186	186	249	265	154	158	228	228	109	131	223	223	235	235	134	134	186	206	231	231	143	177
Z327	166	166	223	223	146	150	200	220	083	089	153	161	231	237	124	126	202	206	233	237	141	169
Z331	134	150	187	239	154	170	200	212	095	109	227	227	237	241	116	116	206	210	239	241	139	139
Z335	158	158	213	215	150	154	200	220	107	109	000	000	237	237	120	124	194	214	227	227	135	173
Z336	158	166	215	231	150	154	190	200	091	127	141	141	225	235	124	134	202	208	225	231	143	151
Z337	158	162	231	235	154	158	208	208	089	095	155	155	227	235	132	140	194	194	235	247	139	143
Z339	154	166	223	231	150	154	200	200	089	089	159	173	237	237	128	132	194	198	235	237	135	143
Z340	144	144	223	231	162	162	200	200	109	131	151	151	237	237	124	130	172	198	233	235	151	169
Z342	158	166	223	239	158	162	210	220	089	127	151	157	229	237	108	108	182	190	241	243	165	169
Z346	134	158	263	271	150	158	190	200	089	109	161	161	229	237	130	130	234	254	277	277	173	183
Z349	170	186	247	275	154	154	000	000	125	131	161	161	205	229	124	138	188	202	237	243	189	189
Z353	158	166	203	235	150	158	190	200	089	107	165	165	229	237	130	140	190	202	235	243	157	169
Z354	158	166	223	267	154	162	000	000	089	131	159	159	223	237	124	130	180	218	231	241	143	165
Z389	166	166	223	227	162	162	200	220	099	107	155	169	229	237	128	128	188	194	243	245	139	165
Z393	166	166	187	195	154	154	212	220	113	113	177	177	229	239	106	112	194	198	235	239	145	161
Z396	132	166	219	219	150	154	220	220	089	107	153	153	237	239	126	126	226	226	229	233	133	173

ANEXO III

Genotipos corregidos con el método de Brookfield I para los loci de microsatélites

FH2010, FH2137 y FH2535.

FH2010		FH2137		FH2535	
200	200	151	151	128	128
212	212	157	159	118	132
220	220	159	173	124	130
212	212	157	163	136	136
220	220	157	177	124	130
212	212	155	159	128	132
200	200	153	153	124	128
200	200	143	143	120	120
232	232	163	165	128	134
220	220	163	163	126	128
224	224	155	169	120	120
220	220	000	000	124	138
200	200	000	000	000	000
200	200	161	161	128	134
200	200	157	157	118	128
200	200	159	159	116	116
220	220	173	173	128	136
212	220	157	165	120	124
200	212	161	161	128	134
208	208	199	199	128	138
192	200	151	151	128	128
200	220	151	157	128	128
220	220	181	231	120	124
220	220	161	173	124	132
200	220	157	157	128	132
220	224	153	161	128	128
208	214	157	157	138	138
228	228	223	223	134	134
200	220	153	153	124	130
200	220	227	227	116	120
200	224	000	000	120	134
190	200	141	141	124	126
208	232	155	157	132	140
200	228	159	159	128	132
200	228	151	169	124	128
210	220	151	169	108	108
190	200	161	161	130	130
000	000	161	175	124	134
190	200	165	165	130	140
000	000	159	185	124	130
200	232	155	155	128	130
212	220	177	177	106	112
220	232	153	161	126	126

ANEXO IV

Cluster asignado a cada individuo en los análisis de agrupamiento con Structure y Geneland. La asignación se realizó a en base a la probabilidad de pertenencia de cada individuo.

Muestra	Structure	Geneland
Z213	1	1
Z396	1	1
Z197	1	1
Z234	1	1
Z289	1	1
Z316	1	1
Z327	1	1
Z300	2	1
Z210	3	1
Z239	1	2
Z393	1	2
Z389	1	2
Z140	1	2
Z133	1	2
Z199	1	2
Z189	1	2
Z317	1	2
Z331	1	2
Z340	1	2
Z304	1	2
Z337	1	2
Z336	1	2
Z313	1	2
Z342	1	2
Z353	1	2
Z349	1	2
Z319	1	2
Z293	2	2
Z346	2	2
Z354	2	2
Z238	3	2
Z175	3	2
Z174	3	2
Z148	3	2
Z203	3	2
Z335	3	2
Z201	3	2
Z325	3	2
Z324	3	2
Z322	3	2
Z286	3	2

ANEXO V

Relaciones de parentesco entre individuos. Se muestran los pares de individuos identificados como medio hermanos (HS) o hermanos completos (FS).

Individuo 1	Individuo 2	Relación
Z133	Z313	HS
Z133	Z314	HS
Z140	Z189	HS
Z140	Z201	HS
Z148	Z300	HS
Z148	Z304	HS
Z148	Z335	HS
Z148	Z354	HS
Z175	Z317	HS
Z175	Z342	HS
Z189	Z293	HS
Z189	Z337	HS
Z197	Z238	HS
Z197	Z319	HS
Z197	Z327	HS
Z213	Z337	HS
Z234	Z396	HS
Z238	Z319	HS
Z238	Z327	HS
Z238	Z349	HS
Z239	Z319	HS
Z239	Z324	HS
Z289	Z293	HS
Z289	Z317	HS
Z289	Z339	HS
Z293	Z316	HS
Z293	Z327	HS
Z293	Z342	HS
Z300	Z317	HS
Z300	Z319	HS
Z300	Z327	HS
Z300	Z349	HS
Z313	Z340	HS
Z314	Z340	HS
Z317	Z322	HS
Z317	Z335	HS
Z317	Z339	HS
Z327	Z396	HS
Z337	Z339	HS
Z342	Z353	HS
Z342	Z354	HS
Z342	Z389	HS
Z346	Z353	HS
Z313	Z314	FS
Z234	Z339	FS